

1/7/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012618805

WPI Acc No: 1999-424909/199936

Use of mono- or disaccharide e.g. mannitol, trehalose, lactose or sucrose  
- as denaturation inhibitor for thrombomodulin

Patent Assignee: ASAHI KASEI KOGYO KK (ASAHI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11171790	A	19990629	JP 9443837	A	19940315	199936 B
			JP 98280707	A	19940315	

Priority Applications (No Type Date): JP 9443837 A 19940315; JP 98280707 A  
19940315

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 11171790	A	5	A61K-038/43	Div ex application JP 9443837

Abstract (Basic): JP 11171790 A

Use of a mono- or disaccharide as a denaturation inhibitor for  
thrombomodulin (TM), is new.

USE - The amount of monosaccharide or disaccharide to TM (1 mg)  
ranges from 0.01-1 mmole.

ADVANTAGE - The inhibitor prevents denaturation of TM in a  
freeze-drying process, and a TM composition without denatured  
substances can be supplied.

Dwg.0/1

Derwent Class: B03

International Patent Class (Main): A61K-038/43

International Patent Class (Additional): A61K-031/00; A61K-047/26

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-171790

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月29日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

A 6 1 K 38/43  
31/00  
47/26

識別記号

A C A  
6 0 7

F I

A 6 1 K 37/465  
31/00  
47/26

A C A  
6 0 7 A  
J

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-280707  
(62) 分割の表示 特願平6-43837の分割  
(22) 出願日 平成6年(1994) 3月15日

(71) 出願人 000000033  
旭化成工業株式会社  
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
(72) 発明者 油井 雅樹  
宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成  
工業株式会社内  
(72) 発明者 鶴ヶ谷 守行  
宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成  
工業株式会社内  
(74) 代理人 弁理士 小林 和憲

(54) 【発明の名称】 トロンボモジュリン用変性防止剤

(57) 【要約】

【解決手段】 単糖類又は二糖類を有効成分とするトロンボモジュリン用変性防止剤である。

【効果】 T Mの凍結乾燥工程での変性による高分子化を防止し、変性物を含まないT M組成物によって、凝固線溶系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を有するT Mを安全な治療薬として供給することができる。

-1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 単糖類又は二糖類を有効成分とするトロンボモジュリン用変性防止剤。

【請求項2】 二糖類が、トレハロース、ラクトース、スクロースのいずれかである請求項1に記載のトロンボモジュリン用変性防止剤。

【請求項3】 単糖類が、マンニトールである請求項1に記載のトロンボモジュリン用変性防止剤。

【請求項4】 トロンボモジュリンが、可溶性のトロンボモジュリンである請求項1～3のいずれかに記載のトロンボモジュリン用変性防止剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トロンボモジュリンの変性防止剤に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、血栓溶解剤として用いられているものには、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼや組織プラスミノゲンアクチベーターがある。また、抗血液凝固剤としてはヘパリンやワーファリンが用いられている。さらに、血小板凝集抑制剤としてはアスピリン、スルフィンピラゾン、ジピリダモール等が使われている。

【0003】これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は、それぞれ別個に、あるいは併用して、たとえば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療および予防に用いられている。しかしながら、これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は非常に複雑な機構から成り立つ血液の凝固線溶系のごく一部に作用するにすぎない。そこで、血液の凝固線溶系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を示す薬剤が求められていた。

【0004】ところで、トロンボモジュリン(以下TMと略称する)はトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する。プロテインCは血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化される。活性化型プロテインCは、生体内で血液凝固系因子の活性化型第V因子、および活性化型第VIII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノゲンアクチベーターの産生に関与していることが知られている(鈴木宏治、医学のあゆみ、第125巻、901頁(1983年))。

【0005】TMは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性化型プロテインCを大量に産生せしめるものである。従って、TMは生体における抗血液凝固および血栓溶解に大きく寄与するものである。前記のように、TMは抗血液凝固作用と血小板凝集抑制作用および血栓溶解

2

作用を有するのでたとえば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症の疾患の治療および予防に用いられることが期待される。

【0006】TMは細胞からの産生量が少ないので、工業的規模での生産は行われていなかった。しかし、遺伝子組み換え体の利用(山本ら、特開昭64-6219号公報)でTMを容易に得ることが可能となり、その医薬品としての開発が行われるようになった。

【0007】TMを抗血液凝固剤あるいは血栓溶解剤として広く安定的に供給するためには凍結乾燥を行って製剤化することは必須の操作である。ところが、本発明者らはTM含有溶液を凍結乾燥すると、微量ではあるが一部が変性によって高分子化し、TM分子がいくつか会合した多量体が生成することを明らかにした。蛋白質の凍結乾燥では水分が一部水和層まで脱水され、部分的に環境が極端に非水化されることによって、蛋白質の構造保持機構が破壊され、変性が起こるものと考えられる。

【0008】TMは医薬品として開発されているものであるため、変性物を含んでいる場合には、その抗原性を含めた安全性が問題となる。このような実状では、その抗血液凝固作用や血栓溶解作用にもかかわらず、治療薬として安全なTM組成物を提供することは不可能である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、変性物を含むTM組成物は人体に投与することは好ましくなく、治療薬として用いる場合は変性物を含まないTM組成物が望ましい。このため、TMの変性による高分子化を防止し、安全で安定なTM組成物を提供するためのTM用変性防止剤が要求される。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記の問題点を解決するために鋭意研究を行った結果、単糖類又は二糖類を添加することで、TMの変性が防止しうることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明は、上記の知見に基づいて完成されたもので、単糖類又は二糖類を有効成分とするトロンボモジュリン用変性防止剤である。

【0011】本発明でトロンボモジュリンとは、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する物質として定義され、特に好ましくは可溶性のトロンボモジュリンが挙げられる。

【0012】まず本発明に用いられるTM原料は公知の方法、またはそれに準じて調製すればよいが、そのようなものとして、例えば、前記山本らの方法(特開昭64-6219号、実施例参照)が挙げられる。すなわち、ヒト由来のTM遺伝子を遺伝子操作技術により調製し、必要に応じた改変を行って組み込んだチャイニーズハム

3

スター卵巣細胞を培養し、培養液から高純度に精製されたもので、細胞質ドメインを含まない可溶型TM、例えば光散乱法にて分子量62,000の可溶TMが挙げられる。

【0013】なお、本発明に用いられるTM原料は、適宜の糖鎖を有していても良い。また本発明に用いられるTM原料の生産方法は、これらに限定されるものではない。すなわち、TMを生産するような組織またはこれら組織培養液から抽出精製するような原料生産法も採用できる。

【0014】一般にはさらに抽出精製工程を経ることにより、適宜等張化剤（塩化ナトリウムなど）、緩衝化剤（リン酸ナトリウムなど）といった塩類を含むTM含有溶液として調製すればよい。本発明のTM用変性防止剤の有効成分である単糖類としては、マンニトールが特に好ましい例として挙げられる。また、二糖類としてはトレハロース、ラクトース、スクロースが好ましい例として挙げられる。

【0015】また本発明におけるトロンボモジュリン用変性防止剤には必要に応じて、アミノ酸およびその塩類からなる群から選ばれた一種または二種以上の有効量が添加されていてもよい。このアミノ酸またはその塩類としては、例えばアルギニン、グルタミン酸、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニンおよびバリンまたはその塩類よりなる群から選ばれた一種または二種以上が挙げられ、好ましくはアルギニンまたはその酸付加塩、グルタミン酸またはその塩基付加塩、ヒスチジンまたはその酸付加塩、リジンまたはその酸付加塩などのアミノ酸またはその塩類や遊離型としてのプロリン、セリン、グリシン、アスパラギン、フェニルアラニン、バリンなどが挙げられる。

【0016】上記の添加物において最も好ましくは、アルギニンまたはその酸付加塩、グルタミン酸またはその塩基付加塩、プロリン、セリンである。アルギニン酸付加塩の場合、付加する酸としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、塩酸、クエン酸、硫酸など、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。同様に、ヒスチジン酸付加塩の場合、付加する酸としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、塩酸、クエン酸、硫酸など、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。

【0017】同様に、グルタミン酸塩基付加塩の場合は、付加する塩基としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、ナトリウム、カリウムなど、ならびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。同様に、リジン酸付加塩の場合、付加する酸としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、たとえば、塩酸、クエン酸、硫酸など、な

4

らびにそれらと機能上同等の物質を挙げることができる。

【0018】上記添加物の他に本発明においては、第3成分として、等張化剤、緩衝化剤などを添加してもよく、特にこれらの影響を受けるものではないが、等張化剤や緩衝化剤に用いられる塩類、特に塩化ナトリウムの濃度が高いことは本発明を用いて凍結乾燥を行う際、ケーキの形成に害を及ぼすこともある。またケーキ形成補助剤あるいはTMの容器への吸着を防止する目的で、適宜アルブミン、ゼラチン等を添加してもよい。

【0019】本発明のTM用変性防止剤を用いる場合には、単糖類又は二糖類としての添加量として、通常TM 1mgあたり0.01~1mmolが例示される。すなわち、添加量が0.01mmol以上となれば好ましい。また、1mmolを越えて添加してもよいが、それは経済的な面において選択することができる。

【0020】本発明のTM変性用防止剤をTMに添加するに際しては、添加方法は特に限定されないが、たとえば、変性防止剤を直接TM含有溶液に添加する方法、またはあらかじめ変性防止剤を水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液に溶解してTM又はTM含有溶液と添加する方法などが挙げられる。

【0021】また、本発明の変性防止剤を用いて製剤を調製する場合には、例えばアンプルまたはバイアルに、水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液1mlあたり0.05~15mg、好適には0.1~5mgのTMおよび上記変性防止剤を含有する溶液を、例えば0.5~10ml充填し、次いで常法により凍結乾燥して注射用製剤として調整できる。このような注射用製剤としては、例えば1日1~3回投与として0.01~100mg含有した凍結乾燥製剤として得ればよい。

【0022】

【発明の実施の形態】以下、実施例及び比較例により本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

実施例 1

注射用蒸留水2ml当たり1mgのTM（ヒト由来のTM遺伝子を遺伝子操作技術により、調製改変して組み込んだチャイニーズハムスター卵巣細胞を培養して得られた、糖鎖を有する光散乱法にて分子量約62,000の可溶型TM；特開昭64-6219号）を含む溶液を調製した。このTM溶液にグルタミン酸ナトリウム0.05mmolを添加した。さらに、該溶液を2mlずつガラスバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥は-40℃で18時間予備凍結し、-40~+20℃、真空度0.05~0.01mmHgで40時間一次乾燥し、ついで20℃、真空度0.05~0.01mmHgで6時間二次乾燥した。

【0023】次いで、この凍結乾燥品を再溶解後、サイズ排除クロマトグラフィー分析を行い高分子化したTM

10

20

30

40

50

5

の割合を求めた。分析には、内径7.5mm、長さ60cmのステンレス管に排除限界分子量50万の親水性シリカゲルを充填したカラムを使用し、0.1M硫酸ナトリウムを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH

6

7.0)を溶離液として、波長210nmで検出した。結果は表1に示した。

【0024】

【表1】

適応例	添加物種類	添加量 (mmol)	変性物割合 (%)
適応例1	グルタミン酸ナトリウム	0.05	0.10
適応例2	プロリン	0.05	0
適応例3	セリン	0.05	0.22
適応例4	グリシン	0.05	0.48
適応例5	ヒスチジナー塩酸塩	0.05	0.65
適応例6	アスパラギン	0.05	0.68
適応例7	リジナー塩酸塩	0.05	0.80
適応例8	フェニルアラニン	0.05	1.07
適応例9	バリン	0.05	1.10
適応例10	アルギニナー塩酸塩	0.01	0.51
適応例11	アルギニナー塩酸塩	0.02	0
適応例12	アルギニナー塩酸塩	0.05	0
適応例13	アルギニナー塩酸塩	0.1	0
適応例14	アルギニナー塩酸塩	0.2	0
適応例15	アルギニナー塩酸塩	0.5	0
適応例16	マンニトール	0.05	0.39

【0025】実施例 2

添加物をトレハロースとした以外は前記の実施例1と同様に行った。

【0026】実施例 3

添加物をラクトースとした以外は前記の実施例1と同様に行った。

【0027】実施例 4

添加物をスクロースとした以外は前記の実施例1と同様に行った。

【0028】実施例 5

添加物として、アルギニナー塩酸塩およびスクロースの

二種を併用し、その添加量をそれぞれ0.05mmolとした以外は前記の実施例1と同様に行った。

【0029】実施例 17

添加物として、アルギニナー塩酸塩0.05mmolおよび精製ゼラチン10mgとした以外は前記の実施例1と同様に行った。

【0030】比較例 1

添加物を加えなかったこと以外は前記の実施例1と同様に行った。結果は表2に示した。

【0031】

【表2】

比較例	添加物種類	添加量 (mmol)	変性割合 (%)
比較例1	添加物なし	0	1.17
比較例2	塩化ナトリウム	0.01	1.35
比較例3	塩化ナトリウム	0.02	1.46
比較例4	塩化ナトリウム	0.05	1.93
比較例5	塩化ナトリウム	0.1	2.07

【0032】比較例 2～5

添加物を塩化ナトリウムとし、添加量を0.01、0.02、0.05、0.1mmolとした以外は前記の実施例1と同様に行った。結果は表2に示した。

【0033】

【発明の効果】前記の実施例および比較例の結果から明らかなように、本発明によれば、TMの凍結乾燥工程での変性による高分子化を防止し、変性物を含まないTM

7

組成物を得ることが可能となる。これによって、凝固線  
溶系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を有するT  
Mを安全な治療薬として供給することが可能となる。

8

【図面の簡単な説明】

【図1】アルギニン塩酸塩の各種添加量に対するTM  
の変性物割合の関係を示す図である。

【図1】

